МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ МЕДИЧНИЙ ІНСТИТУТ

На правах рукопису

КУЗНЕЦОВА Олена Володимирівна

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК ЕНДОРФІНІВ, ВАЗОПРЕСИНУ, НАТРІЙУРЕТИЧНОГО ПЕПТИДУ ПЕРЕДСЕРДЬ І ТКАНИННИХ ГОРМОНІВ З РЕГУЛЯЦІЄЮ ВОДНОГО БАЛАНСУ ОРГАНІЗМУ В НОРМІ ТА ПРИ ГІПЕРТЕРМІЇ

03.00.04 — Біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Харків — 1994

Дисертація є рукопис.

Робота виконана в науково-дослідницькому центрі Луганського медичного інституту.

Науковий керівник: доктор медичних наук, старший науковий співробітник **Ірина Олександрівна КОМАРЄВЦЕВА**

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор **Валерій Антонович БОНДАРЕНКО**

доктор медичних наук **Всеволод Іванович ГУБСЬКИЙ**

Провідна установа: Український державний медичний університет ім. акад. О. О. Богомольця, м. Київ

Захист дисертації відбудеться «14» квітня 1994 р. о 14 год на засіданні спеціалізованої ради Д 088.23.04 при Харківському медичному інституті (м. Харків-22, пр. Леніна, 4).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Харківського медичного інституту.

Автореферат розіслано. 10 березня 1994р.

Вчений секретар спеціалізованої ради **к. б. н. Л. О. ЖУБРІКОВА**

Актуальність проблеми.

Система регуляції водно-електролітного гомеостазу складається з підсистем, тісно зв'язаних і взаємодіючих одна з одною:

1) центральної - супраоптичні та паравентрікулярні ядра гіпоталамуса, гіпотетичний центр середнього мозку, який пов'язаний з епіфізом і виділяє гломерулотропний гормон (ГТГ), ядра заднього гіпоталамуса, під контролем яких знаходиться секреція передньої та задньої долі гіпофіза АКТГ, вазопресину, оксітоцину, ендорфінів (D.Jessop, 1990; K.Ota, 1990);

2) проміжної - натрійуретичний пептид передсердь (НУПП) - відсутня ланка у сплетінні нейрогуморального механізму регуляції водно-сольового обміну (I.Burnett, 1990; Y.Izumi, 1990; W.Wechter, 1990), відкриття якого, проте, не пояснило існуючі ефекти, які відносяться до натрійуретичного фактору центрального, або ниркового походження;

3) гормональної внутрініркової - взаємообумовлені ренін-ангіотензін-альдостеронова та простагландін-кінінова системи антинаправленої дії на гідро- і натрійурез;

4) інформаційної, яка об'єднує багаточисленні об'ємні, осмотичні та іонні рецептори, локалізовані в камерах серця, синокаротидній зоні, стінках судини артеріального дерева, венах грудної порожнини, інтерстиції легенів тощо (P.Chabrier, 1990).

Фізіологічні ефекти регуляторів і медіаторів водно-електролітного балансу тісно пов'язані не тільки з біохімічними процесами живої клітини (активація аденілатциклази, синтез цАМФ, цГМФ, утворення простаноїдів із поліненасичених жирних кислот фосфоліпідів мембран, вмикання Ca^{++}-кальмодулінового або фосфоінозітольного механізму сприйняття гормонального стимулу), але і змінюють фізико-хімічну структуру розподілу тканинної рідини, яка залежить від стану білкового матріксу живих клітин, т.б. натівності його або денатурації (наприклад, під впливом гіпертермії), що відображається на характері полярізації води у мультішарах навколо білкової глобули в першому випадку, або уздовж розкрученого поліпептидного сплетіння - в іншому варіанті, товщині зв'язаної структурної або гідрованої фракції тканинної води (G.Ling, 1988).

Великий інтерес викликає з'ясування значення ендогенних опіоїдів, вазопресину, НУПП і тканинних гормонів у регуляції водно-електролітного гомеостазу, з яким пов'язано підтримання теплообміну організму або розвиток теплового захворювання в умовах підвищеної температури навколишнього середовища (К.П.Іванов, 1975; А.Д.Слонім,

1980).

Вивчення ролі ендорфінів і енкефалінів, вазопресину та НУПП у гормональній регуляції водного балансу організму у нормі та при гіпертермії дозволяє вивчити невідомі до цього часу взаємовідношення між ендорфінами, вазопресином, НУПП і тканинними регуляторами (простагландінами (ПГ), цАМФ, цГМФ, Ca^{++}) у корі та медулі нирок, установити нейрорегуляторні механізми адаптації гомеостазу до теплового стресу, відкрити нові ланки патохімії і патофізіології гіпертермії на рівні гуморально-клітинних взаємодій.

Робота виконана в межах комплексної наукової програми АН і АМН СРСР "Фундаментальні науки - медицині", а також планової держбюджетної тематики НДЦ Луганського медичного інституту "Нейрогуморальна регуляція водно-електролітного гомеостазу" та "Створити систему забезпечення життя гірників під час промислових катастроф на вугільних шахтах. Розробити методи інтенсивної терапії при комбінованому впливі механічних, термічних факторів та токсичних газів" (реєстраційний номер 0191005567).

Мета роботи.

Вивчити взаємозв'язок ендогенних опіоїдів, вазопресину, НУПП і тканинних гормонів з регуляцією водного балансу організму в нормі та при гіпертермії.

Відповідно до поставленої мети завданням роботи було:

1. Дослідження дії вазопресину, β-ендорфіну, мет-енкефаліну й НУПП на транспорт води в чиркових зрізах.

2. Вивчити характер впливу вазопресину, β-ендорфіну, мет-енкефаліну й НУПП на ендогенний біосинтез простацикліну, TxB_2, $ПГE_2$ і $ПГF_{2\alpha}$, кількість цАМФ, цГМФ, іонів натрію й кальцію в корі та медулі нирок щурів Вістар.

3. Визначити рівень АКТГ, β-ендорфіну, мет-енкефаліну, тироксину (Т4), трийодтироніну (Т3), тироксинеднального глобуліну (ТСГ), тиреоглобуліну (ТГ), ПТГ, кальцитоніну, альдостерону, активності реніну плазми (АРП), pH плазми крові та концентрацію іонів натрія й кальція в крові тварин, які підлягають дії підвищеної температури.

4. Вивчити особливості біосинтезу $ПГE_2$ і $ПГF_{2\alpha}$ із ендогенних попередників, кількість цАМФ, цГМФ, іонів натрію й кальцію в тканині нирок (корі та медулі) і легенів (правої та лівої) щурів, які підлягають тепловому стресу.

5. Вивчити показники ЯМР-релаксації протонів тканинної води мозку, передсердь серця, нирок та кори нирок щурів Вістар до і після гіпертермії.

Наукова новизна роботи.

Вперше проведено комплексне дослідження впливу вазопресину, ендогенних опіоїдів (ендорфінів та енкефалінів) і НУПП на зональний (у корковій та медулярній ділянці нирок) біосинтез ПГ (простацикліну, TxB_2, $ПГE_2$ і $ПГF_{2\alpha}$) у кореляції з кількістю циклічних нуклеотидів та іонів натрію й кальцію в нирковій тканині. Виявлений взаємозв'язок змін у системі другорядних посередників клітинної відповіді на вазопресин, β-ендорфін, мет-енкефалін і НУПП з перерозподілом між вільною, гідрованою й кристалічною фракціями тканинної води нирок. Надана порівняна характеристика механізму гідроосмотичної дії вазопресину й β-ендорфіну. Описаний механізм гідроосмотичної дії ендорфінів на клітину.

Вперше вивчений вплив підвищеної температури навколишнього середовища на рівень ендогенного біосинтезу $ПГE_2$ і $ПГF_{2\alpha}$ у корі та медулі нирок, лівій та правій легені. Виміряні Т1- та Т2-показники релаксації протонів тканинної води мозку, передсердь серця, нирок та кори нирок щурів після гіпертермії, які відобразили молекулярно-структурну різноманітність фракційного складу тканинної рідини важливих для життя органів в умовах дегідратації організму.

Вперше розглянуто стан гіпоталамо-гіпофізарної, тиреоїдної, натрійуретичної (НУПП), кальцій-контролюючої (ПТГ, кальцитонін), ренін-ангіотензін-альдостеронової регуляції в асоціації з внутріклітинними модуляторами нейрогуморального стимулу на тканинах-мішенях в умовах гіпертермічного стресу, що дозволило віддиференціювати й сформулювати схему патогенетичних та адаптаційно-компенсаторних біохімічних механізмів гіпернатріємії з облігатною утратою осмотично вільної води, яка спостерігається внаслідок гіпертермії.

Практична значущість роботи.

Розроблений метод вивчення впливу біологічно активних речовин на рівень ендогенного біосинтезу простаноїдів (простацикліну, TxB_2, $ПГE_2$ і $ПГF_{2\alpha}$) і кількість циклічних нуклеотидів та електролітів у нирковій корі та медулі, який поєднує в собі точність і високу ефективність поряд з простотою відтворення, дозволяє проводити дослідження з невеликою кількістю тканини і може бути застосований для вивчення обміну ПГ не тільки в нирковій тканині, а й в інших тканинах.

Виявлений рівень гормонів у крові, біосинтезу ПГ, концентрації цАМФ, цГМФ, іонів натрію й кальцію в корі та медулі нирок, правої та лівої легені, часу подовжньої та поперечної релаксації протонів тканинної води мозку, передсердь серця, нирок та кори нирок щурів

можуть бути використані як показники ступеня патологічного процесу в умовах гіпертермії.

Результати з'ясування взаємозв'язків ендогенних опіоїдів, вазопресину, НУПП і тканинних гормонів з регуляцією водного балансу організму при гіпертермії дозволили дати експериментальне обгрунтування патогенетичним рекомендаціям компенсації організму під час теплового стресу, який має місце в умовах як виробництва (глубинні шахти, металургійні комбінати, гарячі цехи харчової промисловості і т.і.), регіонів жаркого клімату, так і наміченої тенденції зміщення сезонних температурних циклів, яка пов'язана з загальним потеплінням на всій планеті у зв'язку з екологічно обумовленим "парниковим ефектом".

Отримані дані впроваджені в учбову програму кафедри медичної хімії за темами: "Водно-сольовий обмін і його регуляція" та "Біохімія нирок", в роботу НПЦ "Резонанс" м.Луганська, Луганського обласного кардіологічного диспансеру, лабораторії патофізіології НДІ педіатрії РАН.

Основні положення, які виносяться на захист:

1. Ендогенні опіоїди мають односпрямований з вазопресином гідроосмотичний ефект на ниркову тканину, протилежний - натрійуретичному пептиду передсердь.

2. Гідроосмотична дія ендорфінів опосередкована регуляторним контролем ендогенного біосинтезу ниркових простаноїдів і системи внутріклітинних месенджерів (циклічні нуклеотиди, Ca^{++}) за двохетапним механізмом "гноблення-збудження".

3. Розвиток у результаті гострої гіпертермії гіпернатріємії з облігатною утратою осмотично вільної води обумовлений каскадом нейрогуморальних реакцій ендогенних опіоїдів та пептидів, ренін-альдостероновою системою як на рівні цілісного організму, так і в органах-мішенях (мозку, передсердях серця, легенях та нирках).

Апробація роботи.

Окремі фрагменти дисертації повідомлені на VI Українському біохімічному з'їзді (1992), науково-практичній конференції "Екологія Донбасу" (м.Луганськ, 1992, 1993), засіданні Луганської групи Донецького відділення Українського біохімічного товариства (1992).

Структура та обсяг дисертації.

Дисертація викладена на 148 стор. машинопису, складається з вступу, аналітичного огляду літератури, розділу "Матеріал, методи та обсяг дослідження", чотирьох розділів власних досліджень, заключного обговорення експериментальних даних, висновків, покажчика

літератури, який включає 40 вітчизняних та 288 іноземних джерел.

Публікації. З теми дисертації опубліковано 6 робіт.

Матеріали і методи дослідження.

Дослідження проведено на 175 білих щурах-самцях лінії Вістар 3-х місячного віку масою від 200 до 250 г. Експериментальна частина роботи виконувалась згідно з Правилами проведення робіт з експериментальними тваринами, які затверджені Наказом МОЗ СРСР N 755 від 12.08.1977 р.

Експериментальною моделлю був патологічний процес, який розвивався у тварин при гіпертермії (+43 -+45°С на протязі години) в спеціальній камері, розробленій співробітниками кафедри реаніматології та анастезіології Луганського медичного інституту (Г.О.Можаев та ін., 1989).

До і після впливу на тварин зважували й вимірювали їх ректальну температуру.

Кількість АКТГ, мет-енкефаліна, ПТГ, альдостерона, активності реніна в плазмі та Т3, Т4, ТСГ, ТГ і кальцитоніна в сироватці крові тварин, які підлягають дії тепла, визначали методом радіоімунного аналізу.

У нашій роботі використаний метод біосинтезу ПГ у нирковій тканині з ендогенних посередників, описаний E.Oliw (1980), у нашій модіфікації.

З метою виявлення характера впливу цих біологічно активних пептидів на ендогенний біосинтез ПГ в нирковій тканині в інкубаційне середовище додавали аргинін-вазопресин (АВП) у дозі 73,6 пмоль/л ("Buhlmann Laboratories AG", Швейцарія), β-ендорфін - 22,1 пмоль/л і мет-енкефалін у дозі 1,5 нмоль/л ("Instar Corporation", США), НУПП - 128 пмоль/л ("Amersham",Німеччина).

Концентрацію 6-кето-ПГ$F_{1\alpha}$ (стійкого метаболіта простацикліна), ТхB_2, ПГE_2, ПГ$F_{2\alpha}$, цАМФ та цГМФ у інкубаційному середовищі визначали методом радіоімунного аналізу.

Кількість ПГ, цАМФ, цГМФ у тканині нирок та легенів перераховували на 1 мг білка тканини, який визначається по Лоурі (Р.Скоупс, 1985).

Концентрацію іонів натрію й кальцію в інкубаційному середовищі та сироватці крові вимірювали методом полум'яної фотометрії (В.Г.Колб, В.С.Камишніков, 1976), pH плазми крові - на цифровому аналізаторі pH і газів крові "ОР -215" (Угорщина).

Про фракційний склад води тканини мозку, передсердь серця, нирок та кори нирок тварин після дії тепла робили висновок з Т1- і

Т2-показників часової релаксації протонів тканинної води, які вимірювали на приладі для ЯМР-релаксометрії "Minispec PC-120" фірми "Bruker" (Німеччина). При наявності двохкомпонентної кривої лінії Т1- і Т2-показники розкладувались на біекспоненти і по показниках Та і Тв розраховували Ра та Рв, які характеризують розподіл між внутрі-(Ра) та позаклітинною (Рв) фракціями тканинної води. Проби для ЯМР-релаксометрії готували, як описано у роботах J.Bell (1989) та K.Kirk (1990).

Для рішення поставленого завдання - вивчення характеру дії АВП, β-ендорфіну, мет-енкефаліну і НУПП на транспорт води в ниркових зрізах - використаний "Спосіб визначення водного балансу організму in vitro на прикладі тканини нирок реєстрацією Т1- і Т2-показників часу релаксації протонів тканинної води методом ЯМР-релаксометрії" (І.О.Комаревцева, 1989).

Одержані результати опрацьовані статистично за допомогою t-критерію Стьюдента (Ю.Ф.Кабатов М.Б.Славін, 1976) і оцінювались вірогідними при P<0,05.

Результати та їх обговорення.

Екскреторна дія НУПП з відомими гемодинамічними ефектами, які викликають збільшення гломерулярної фільтрації, перерозподіл перітубулярного натиску удовж медулярних збірних трубок, медулярний перерозподіл кровотоку (D.Dunn et al., 1986; P.Weidmann et al., 1986) опосередкована системою ниркових простаноїдів. При цьому, як показали наші дослідження, дія НУПП виражена більшою мірою на ендогенний біосинтез вазоактивних простаноїдів - простацикліну та тромбоксану - у корі нирок - місці мікроциркуляторно-фільтраційних процесів. НУПП стимулював синтез 6-кето-ПГ$F_{1\alpha}$ і ТхB_2 у корковій ділянці нирок, але не впливав на їх кількість у медулі нирок.

Виявлене нами внаслідок впливу НУПП підвищення в 3,8 разу концентрації цГМФ у медулі нирок і відсутність зміни кількості цАМФ у порівнянні з контролем в цій зоні нирок підтверджують дійчу точку зору про наявність у збірних трубках мозкового шару нирок тільки одного типу рецепторів для НУПП, які сполучені з гуанілатциклазою (M.Gunning et al., 1988).

В корі нирок у присутності НУПП ми спостерігали зниження рівня цГМФ у 7,5 і цАМФ у 5,9 разу. Низька кількість цГМФ гальмує активність аденілатциклази (О.І.Шахматова, Ю.В.Наточин, 1988) і зменшує концентрацію цАМФ у цій ділянці нирок.

У результаті зниження кількості цАМФ у нирках підвищується рух води за осмотичним градієнтом (J.Orloff, 1981). Ми спостерігали в

ЯМР-експерименті підвищення маси ниркових зрізів, які інкубували з НУПП, з 806,5±8,9 мг до 921,3±7,3 мг і подовження часу подовжньої (Т1) релаксації протонів тканинної води, тоді як час поперечної (Т2) релаксації був як під час інкубації з фізіологічним розчином (Т1=662,0±4,2 мс; Т2=87,0±0,4 мс у присутності НУПП та Т1=623,0±3,6 мс; Т2=88,0±0,3 мс у групі фізіологічного розчину).

Така зміна Т1-показника говорить про формування міцного гідрованого шару в позаклітинному (Рв) просторі (Ра=63,6±0,3%, Рв=36,4±0,3% у присутності НУПП та Ра=93,8±0,24%, Рв=6,2±0,24% у групі з фізіологічним розчином), що свідчить про прямий вплив НУПП на тубулярні транспортні процеси.

Регуляторна біосинтетична активність НУПП на ниркові простаноїди, які володіють гемодинамічною, натрій- та діуретичною властивістю різної спрямованності на тканинному рівні, робить їх ключевою ланкою механізму дії цього пептиду на нирки.

Найбільше вивчено взаємовідношення тканинних простаноїдів з вазопресином. Згідно з схемою негативного зворотнього зв'язку гальмування ПГ-дії вазопресину підвищує рівень циркулюючого АВП (S.Ischikawa et al., 1981; E.Bojanouska, 1989), що згодом повинно відбитися на біосинтезі ПГ.

У нашому дослідженні АВП у корі нирок підвищував кількість $ПГЕ_2$ у 2,8 разу, одночасово знижуючи утворення 6-кето-$ПГF_{1\alpha}$ у 1,4 , $ТхВ_2$ - 2,06 і $ПГF_{2\alpha}$ - 1,9 рази. Отримані результати підтверджують існуючу точку зору про вибіркову стимуляцію біосинтезу $ПГЕ_2$ у клітках коркового шару під впливом вазопресину (A.Garcia-Perez,W.Smith,1984; L.Levine, 1984). У медулі нирок АВП не тільки не стимулював утворення простацикліну, $ТхВ_2$, $ПГЕ_2$ і $ПГF_{2\alpha}$, а навіть знижував їх концентрацію: 6-кето-$ПГF_{1\alpha}$ у 1,2 , $ТхВ_2$ - 2,3 , $ПГЕ_2$ - 2,4 і $ПГF_{2\alpha}$ - 2,8 рази. Аналогічні дані, які одержані на культурі збірних трубок papilla кроликів, наведені F.Grenier зі співавт. (1981).

Зараз є неясність, з якими рецепторами пов'язана дія вазопресину на біосинтез ПГ у епітелії збірних трубок нирок.

Взаємодія вазопресину з V1-рецепторами викликає визволення іонів кальцію у середину клітини(V.Doyle, U.Ruegg, 1985). Ми спостерігали підвищення в інкубаційному середовищі зі зрізами кори нирок концентрації іонів кальцію. У присутності іонів кальцію активізується фосфоліпаза A_2 , яка звільняє з фосфоліпідів клітинних мембран, триацилгліцеринів та естерифікованого холестерина (E.Olin, 1979) арахідонову кислоту - основний посередник простаноїдів, що приводить до індукції синтезу ПГ. Кінцевим результатом цього проце-

су є синтез $ПГЕ_2$ у корковій зоні нирок, який знижує клітинну відповідь на вазопресин, гальмуя активність гормон-залежної аденілатциклази (C.Herman et al., 1979) і цим самим утворення цАМФ у корі нирок в нашому дослідженні у 11,8 разу. У медулі нирок під впливом АВП кількість цАМФ зменшувалась у 1,5 разу.

Підвищення іонів кальцію інгібірує активність гуанілатциклази (K.Gerking, 1988), внаслідок чого зменшується у 5 разів кількість цГМФ у корі нирок. Останнє сприяє меньшій стимуляції аденілатциклази і також синтезу цАМФ (О.І.Шахматова, Ю.В.Наточин, 1988). Концентрація цГМФ у мозковій ділянці нирок зменшувалась у 7 разів. Таким чином, $ПГЕ_2$ може модулювати активність стимульованої вазопресином аденілатциклази, регулюючи синтез цГМФ.

З іншого боку, відсутність динаміки концентрації іонів кальцію в інкубаційному середовищі зі зрізами мозкової речовини нирок, що пов'язано з відсутністю сполучених з іонами кальцію V1-рецепторів для вазопресину в цій зоні нирок, де виявлені переважно рецептори V2-типу (S.Jard, 1985; M.Vallotton et al., 1986), згоджується з гальмуванням АВП ендогенного біосинтезу ПГ всіх типів у медулі нирок у нашому експерименті.

Через те що тільки низькі дози $ПГЕ_2$ інгібують активність АВП-стимульованої аденілатциклази і рівень біосинтезу ПГ у медулі нирок на багато разів вище, ніж у їх корі (Х.М.Марков та інш., 1986; S.Sato, M.Dunn, 1984), то під впливом АВП рівень ендогенного біосинтезу $ПГЕ_2$ знижується до такого рівня, коли $ПГЕ_2$ утискує активність ферменту і знижує утворення цАМФ у мозковій речовині нирок у in vitro експерименті.

Рівень біосинтезу ПГ у медулі нирок, як і у їх корі, знижується, певно, також при участі цАМФ (D.Schlondorff et al., 1985a). Як відомо, цАМФ, будучи посередником внутріклітинної відповіді на вазопресин (T.Dousa et al., 1971; S.Jard et al., 1975), через каскад протеїнкіназних реакцій змінює проникнення люмінальної мембрани, внаслідок чого підвищується реасорбція води за осмотичним градієнтом у ниркових канальцях (R.deSousa, A.Grosso, 1981; J.Orloff, 1961). Шляхом вивчення T1- та T2-показників релаксації протонів тканинної води ниркових зрізів, які інкубували з АВП, (T1=555,0±3,8 мс; T2=75,0±0,21 мс; T1=623,0±4,2 мс; T2=88,0±0,3 мс після інкубації з АВП та у фізіологічному розчині відповідно), ми виявили що вазопресин не тільки перешкоджував руху води за осмотичним градієнтом, а й навіть її реасорбував назад у середовище інкубації, про що свідчить зменшення маси ниркових зрізів, які інкубу-

вали з АВП, на 21,1±1,2 мг, виконуючи тим самим свою відому фізіологічну роль. Гідроосмотичний ефект вазопресину виявляється завдяки зниженню вільної та гідрованої фракцій позаклітинної (Рв) води тканини нирок (Ра=97,6±0,35%; Рв=2,4±0,35% у порівнянні з Ра=93,8±0,24%; Рв=6,2±0,24% під час інкубації у фізіологічному розчині).

Що торкається взаємозв'язку вазопресину з транспортом натрію, то пряма дія вазопресину на транспорт натрію ще не доказана. У нашому дослідженні вазопресин збільшував вихід натрію до інкубаційного середовища зі зрізами кори та медули нирок, певно, завдяки своєї згідності підвищувати проникнення канальців нирок для натрію (M.Burg 1981).

Якщо про пряму дію вазопресину на транспорт натрію говорити важко, то опіоїдні пептиди безпосередньо збільшують активну інтстіальну асорбцію електролітів, що виявлено в експериментах in vitro (J.McKay et al., 1981). У нашому дослідженні β-ендорфін та мет-енкефалін знижували кількість натрію в інкубаційному середовищі зі зрізами медули та кори нирок, виявляючи тим самим антинатрійуретичний ефект, який медіїрується, як вважають H.Binder зі співавт. (1984), неідентифікованими інтермедіаторними агоністами.

Результати вивчення впливу β-ендорфіну і мет-енкефаліну на транспорт води в ниркових зрізах свідчать про те, що вони виявили східний з АВП гідроосмотичний ефект, при цьому маса ниркових зрізів не змінювалась у порівнянні з нативними зрізами, а Т1- та Т2-показники були набагато скорочені, ніж під час впливу АВП, практично наближалися до показників неінкубованої тканини нирок. Але якщо вазопресин знижував фракцію вільної та гідрованої води у позаклітинній (Рв) воді, то у присутності β-ендорфіну наявність цих фракцій тканинної води нирок зменшувалась у внутріклітинній (Ра) воді (Ра=82,4±0,31%, Рв=17,6±0,31% і Ра=93,8±0,24%, Рв=6,2±0,24% у присутності β-ендорфіну і у фізіологічному розчині відповідно). Мет-енкефалін не впливає на розподіл між поза- та внутріклітинною фракціями тканинної води нирок.

Використана нами методика ендогенного біосинтезу ПГ дозволила установити роль опіоїдів у ендогенному біосинтезі ПГ, пояснити тим самим ефекти, які ми спостерігали у ЯМР-експерименті. З наших даних видно, що β-ендорфін значно утискував біосинтез $ПГЕ_2$ - у 17,7 разу, $ПГF_{2\alpha}$ - 2 , 6-кето-$ПГF_{1\alpha}$ - 1,5 ,$ТхВ_2$ - 2,8 разу в медулі нирок; у корі нирок знижувався рівень $ПГЕ_2$ і $ПГF_{2\alpha}$ у 4 рази, $ТхВ_2$ незначно змінювався, а кількість 6-кето-$ПГF_{1\alpha}$ не змінювалась у порівнянні з контролем.

Дія мет-енкефаліну на рівень біосинтезу ПГ, як і його гідроосмотичний ефект, виявлена не стільки вираженою: у медулі нирок біосинтез простацикліну знижувався незначно, інші класи ПГ не змінювались у порівнянні з контролем, з одного боку, а з іншого - у корі нирок мет-енкефалін значно підвищував ендогенний біосинтез простацикліну - у 5,2 та $ТхВ_2$ - 2,3 разу, що, враховуючи локалізацію даного процесу й судиннореактивну функціональність цих простаноїдів, вказує на вазозалежний механізм дії мет-енкефаліну нарівні з гідроосмотичним та антинатрійуретичним.

Зниження кількості незв'язаного кальцію в інкубаційному середовищі зі зрізами нирок у присутності β-ендорфіну тісно пов'язано з утискуванням їм ендогенного медулярного біосинтезу ПГ. Підвищення виходу Ca^{++} до інкубаційного середовища з корковою речовиною нирок під час дії β-ендорфіну, незважаючи на зниження утворення ПГ в цій фракції, вказує на складність та багатоплановість як самого механізму дії ендорфінів, так і ефектів їми викликаних.

Вплив мет-енкефаліну на концентрацію іонів кальцію в інкубаційному середовищі був таким, як і β-ендорфіну.

Що стосується впливу опіоїдів на кількість циклічних нуклеотидів у корі та медулі нирок, то у нашому дослідженні β-ендорфін підвищував рівень цАМФ та цГМФ як у корі, так і у медулі нирок: цАМФ у 2,6 , цГМФ - 3,4 разу і цАМФ у 3,3 , цГМФ - 6,6 разу відповідно в корі та медулі нирок.

У присутності мет-енкефаліну кількість цАМФ не змінювалась ні у корі, ні у медулі нирок. А концентрація цГМФ зменшувалась у 1,5 разу у корі нирок і підвищувалась у 1,7 разу у їх медулі.

Механізм дії опіатів на клітину можна подати таким чином (рис.1). Після зв'язування ендогенного опіоїду зі своїм рецептором на поверхні клітинної мембрани відбувається одночасово утискування базальної або стимульованої $ПГЕ_2$ аденілатциклази (АЦ) і звільнення кальція із мембранних депо. Вихід кальцію в клітині активізує фосфоліпазу $А_2$, яка, з одного боку, стимулює синтез ПГ із поліненасичених жирних кислот (ПНЖК), з іншого - синтез із кардіоліпіну (ЛК) фосфоліпідів мембран мітохондрій лізокардіоліпіну (ЛКЛ), який збільшує проникність мембран мітохондрій для K^+, що в поєднанні з викликаним опіатами гальмуванням активності переносника аденіннуклеотидів інгібірує окислюване фосфорилювання, знижуючи утворення АТФ у мітохондріях (Ю.В.Євтодієнко та інш., 1977). Первинне утискування опіатами аденілатциклази зменьшує синтез цАМФ із АТФ, з одного боку, а з іншого - цей процес сповільнечий у зв'язку з недостачею

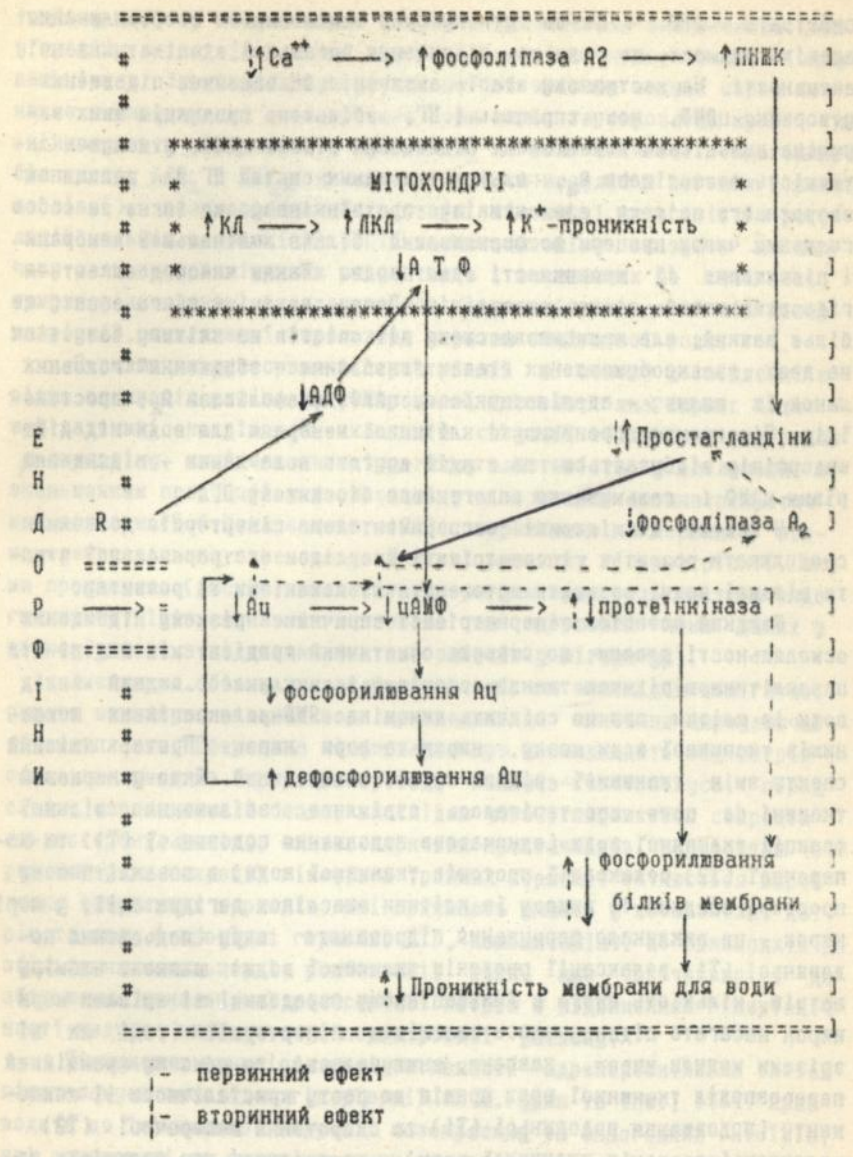

Рис.1. Механізм гідроосмотичного ефекту ендогенних опіоїдів на клітину

субстрата - АТФ - із-за утискування окислюваного фосфорилювання аденілатциклази, що веде до підвищення загальної аденілатцикланої активності. На наступному етапі активація АЦ викликає підвищення утворення цАМФ, чому сприяють і ПГ, збільшена продукція яких запущена кальцієвим механізмом. Підвищений рівень цАМФ, утискуючи активність фосфоліпази A_2, гальмує тим самим синтез ПГ за принципом зворотнього зв'язку, але активізує протеїнкіназу, що тягне за собою головним чином процеси фосфорилювання білків люмінальної мембрани і підвищення її проникності для води. Таким чином досягається гідроосмотичний ефект ендорфінів. Певно, механізм цього ефекту ще більш важкий, але принципова схема дії опіатів на клітину базується на двох взаємообумовлених етапах "гноблення - збудження" головних ланок їх впливу - аденілатциклази, цАМФ, фосфоліпази A_2, простаноїдів. Підвищення проникності клітинної мембрани для води під дією ендорфінів відбувається на стадії другого кола ланки - підвищення рівня цАМФ і гальмування ендогенного біосинтезу ПГ.

У нашому дослідженні експериментальна гіпертермія дозволили смодулювати розвиток гіпернатріємії внаслідок екстраренальної утрати вільної води, розкрити патогенетичні механізми її розвитку.

Швидкий розвиток гіпернатріємії спричинює різкому підвищенню осмоляльності плазми, що створює осмотичний градієнт між внутрі- та позаклітинною рідиною тканин орагнізму і викликає швидкий вихід води із клітин, про що свідчить динаміка ЯМР-релаксаційних показників тканинної води мозку, нирок та кори нирок. Проте, якісний спектр змін тканинної рідини сугубо специфічний. Якщо у нирковій тканині de novo спостерігалось стрімливе збільшення вільної фракції тканинної води (одночасове подовження подовжньої (T1) та поперечної (T2) релаксації протонів тканинної води) в позаклітинному просторі завдяки її виходу із клітини внаслідок дегідратації; у корі нирок - це викликало формування гідрованого шару (подовження подовжньої (T1) релаксації протонів тканинної води) навколо набміру натрію, кількість якого в інкубаційному середовищі зі зрізами кори нирок набагато підвищувалось внаслідок гіпертермії (тоді як зі зрізами медули нирок, навпаки, знижувалась), то у мозку фракційний перерозподіл тканинної води привів до росту кристалічного її компоненту (подовження подовжньої (T1) та скорочення поперечної (T2) релаксації протонів тканинної води), що свідчить про наявність великої кількості місць зв'язку (наприклад, натрія) і товстих мультишарів гідрованої води (G.Fullerton et al., 1982).

Підвищення у нашому дослідженні кількості циклічних нуклео-

тидів у корі та медулі нирок і цГМФ з одночасовим зменьшенням цАМФ у правій та лівій легені щурів, динаміка концентрації іонів кальцію: у інкубаційному середовищі зі зрізами медули нирок незначно зменшувалась, а зі зрізами кори нирок та сироватці крові - не змінювалась у порівнянні з контролем, на фоні активації ендогенного біосинтезу $ПГЕ_2$ і $ПГF_{2\alpha}$ у нирках (корі та медулі) й легенях (правої та лівої), різноспрямованість змін кількості антагоністів регуляції кальція в організмі - ПТГ та кальцитоніну вказують на ключеву роль внутріклітинних регуляторів , замикаючих на собі весь комплекс наслідків і становлення адаптаційних механізмів гіпернатріємії, викликаної переважно утратою облігатної води.

Посилюючим фактором гіпернатріємії в нашому дослідженні є різка активація ренін-альдостеронової системи, яка сприяє подальшій затримці натрію. У складеній ситуації збільшення утворення β-ендорфіну, який має антидіуретичну властивість, у сполученні зі зменьшенням продукції мет-енкефаліну з переважно антинатрійретичним ефектом (І.О.Комарєвцева, 1989), спрямовано на корекцію водно-електролітного гомеостазу. У схемі розвитку гіпернатріємії, яку ми пропонуємо (рис.2), компесаторно-регуляторна роль системи ендогенних опіоїдів явна і заснована на одержаних нами даних у відповідності з відомими ефектами опіатів у літературі.

Зменшення об'єму позаклітинної рідини внаслідок облігатної утрати осмотично вільної води призводить до зниження циркулюючого об'єма плазми. Еферентна інформація про це надходить від натрій-, осмо-, волюмо- та барорецепторів до гіпофіз-гіпоталамуса, передсердь серця, macula densa, внаслідок чого стимулюється секреція альдостерону, реніну, синтез ниркових простаноїдів, пермісивно через контроль секреції гіпофізом тропних гормонів змінюється вироблення ефекторних гормонів, які приймають участь у метаболізмі натрію та води (тиреоїдні гормони, ПТГ, кальцитонін), що призводить до збільшення канальцевої реабсорбції води, але одночасово і до збільшення канальцевої реабсорбції натрію з підвищенням гіпертонічності медули нирок та гіпернатріємії цілому.

Підвищення функціональної активності адренореактивних систем гіпоталамуса внаслідок гіпертермії (В.М.Гурин та інш., 1984) призводить до інтенсивної секреції вазопресину та ендогенних опіоїдів, які спрямовані на антидіуретичну активність та на редукцію тепла і гальмування теплопродукції, з одного боку. З іншого боку - затримка натрію в організмі, яка викликає зниження зв'язування агоністів і збільшення афінітета рецепторів до опіатних антагоністів

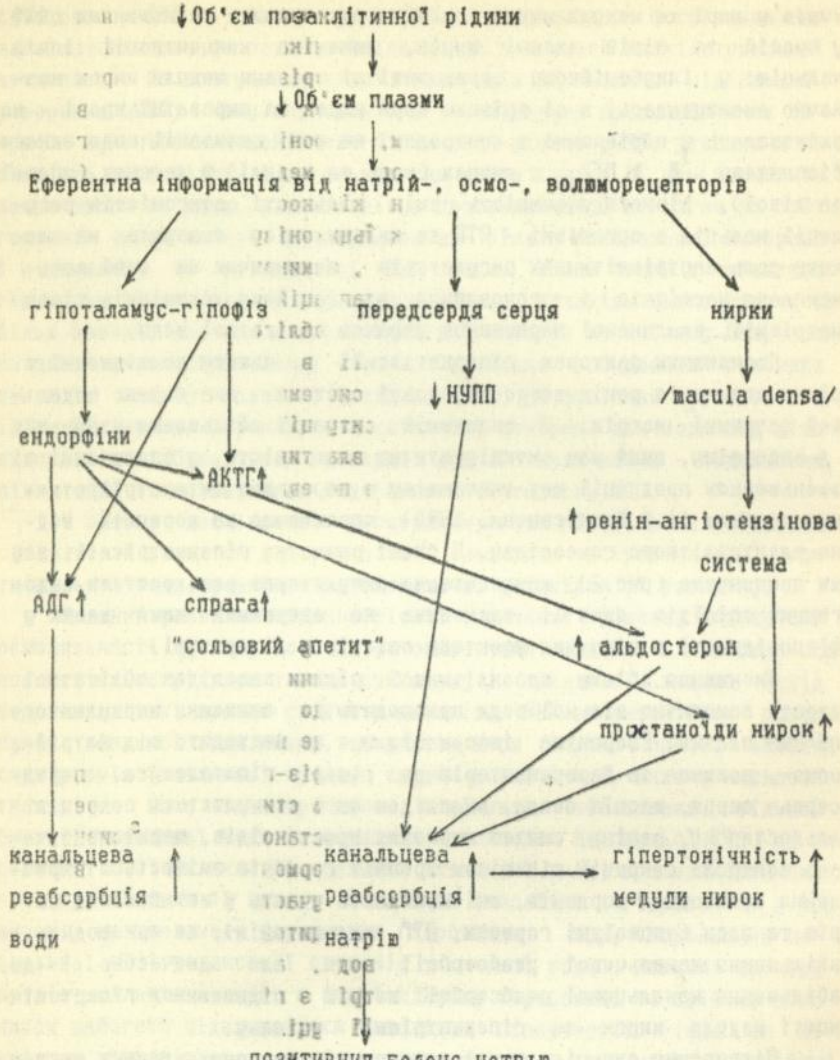

Рис.2 Механізм розвитку гіпернатріємії на фоні облігатної утрати осмотично вільної води

(О.І.Майський та інш., 1982), завдає до гноблення синтезу мет-енкефаліна, що у кінцевому результаті спричиняє ослаблення його стимулюючої дії на альдостерон (G.Linson et al., 1981), звільнення з-під його контролю синтезу реніну або через альдостерон, або безпосередньо (M.Benuck, N.Marks, 1979), або через взаємозв'язок на рівні енкефаліназ - субстратів ангіотензін-перетворюючого ферменту (J.Reid, P.Rubin, 1987).

Вже на стадії пригноблення НУПП починається його фізіологічна противодія, тому що тільки низькі дози пептиду гноблять секрецію реніну, тоді як високі його дози сприяють, навпаки, стимуляції активності реніну (P.Weidmann et al., 1988). Гостра зміна об'єму плазми активізує в мозку секрецію натрійуретичного пептиду, ідентичного передсердньому (V.Buckalew, 1986), який виявляє центральну дію на рівень вазопресину, активність реніну плазми і навіть β-ендорфіну, стимулюючи ниркові екскреторні функції (K.Obana et al., 1985a; J.Horvath et al., 1986).

Таким чином, натрій- та діуретичні гуморальні системи зрівноважують дію пресорних. Взаємодія та балансування антагоністичних систем по відношенню до метаболізму натрію та води і обумовлюють фізіологічну норму гомеостазу, ендорфін-енкефалінергічна система при цьому виступає ведучим регулятором та інтегратором центральних й периферийних механізмів на основі нейрогуморальних взаємозв'язків.

ВИСНОВКИ

1. Ендогенні опіоїди виявляють гідроосмотичний ефект на ниркову тканину (β-ендорфін> мет-енкефалін), односпрямований з вазопресином, який перешкоджує струменю рідини за осмотичним градієнтом.

2. Вазопресин, який підвищує швидкість протонної дифузії у кристалічній фракції тканинної води, дегідрірує вільну та гідрірову фракції води переважно в позаклітинній рідині, яка поступила за осмотичним градієнтом у тканину нирок.

3. Інкубація ниркових зрізів з β-ендорфіном перешкоджує осмотичному руху рідини, про що свідчить константна маса ниркових зрізів, перерозподіл внутрі- та позаклітинної води, скорочення одночасово показників повдовжньої та поперечної ЯМР-релаксації протонів тканинної води, які наближаються до показників нативних нирок.

4. Динаміка ЯМР-релаксаційних показників протонів тканинної води в ниркових зрізах свідчить про стимулюючу дію НУПП на струмінь рідини за осмотичним градієнтом, що вказує на пряму дію цього пеп-

тиду на механізм канальцевого транспорту як антагоніста вазопресину і ендорфінів за кліренсом осмотично вільної води.

5. Гідроосмотичний ефект опіоїдів опосередкований регуляцією ендогенного біосинтезу ниркових простаноїдів з наступною модуляцією внутріклітинних месенджерів (цАМФ, Ca^{++}) за двохетапним каскадом реакцій "гноблення-збудження".

6. Регуляторна біосинтетична дія НУПП на вазоактивні ниркові простаноїди переважно у корковому шарі вказує на гемодінамичний механізм його екскреторної дії.

7. Розвиток гіпернатріємії з облігатною утратою осмотично вільної води внаслідок гострої гіпертермії посилюється активацією ренін-ангіотензінової та альдостеронової систем, дисбалансом ендогенного біосинтезу натрій- та антинатрійуретичних ниркових простаноїдів, порушенням регуляторної ланки метаболічних процесів клітини та організму цілому.

8. В умовах гіпертермії підвищення утворення гідроосмотичного β-ендорфіну на фоні зниження кількості met-енкефаліну, який має в більшому ступені антинатрійуретичний ефект, свідчить про компенсаторно-адаптаційну роль ендогенних опіоїдів як центральних нейрогуморальних регуляторів водно-електролітного гомеостазу.

Список робіт, опублікованих за матеріалами дисертації:

1. Вплив вазопресину та ендорфінів на ендогенний біосинтез простагландінів у нирках щурів in vitro //Тез.доп.VI Укр.біохім.з'їзду. -Київ,1992.-ч.III.-С.133.(в співавт.Є.В.Сабадаш, І.О.Комаревцева).
2. Дія натрійуретичного пептиду передсердь на ЯМР-релаксаційні показники протонів тканинної води нирок in vitro //У зб. наук. праць співробітників ЛМІ.-Луганськ,1993.-С.24-25, (в співавт. О.А.Орлова, І.О.Комаревцева).
3. Динаміка ЯМР-релаксаційних характеристик протонів тканинної води мозку, передсердь серця, нирок та кори нирок щурів, які підлягають тепловому стресу //У зб.:"Біологічно активні речовини та регуляція функції мозку". -Харків, 1993. -С.
4. Ca^{++}-залежний механізм дії ендорфінів на ендогенний нирковий біосинтез простаноїдів //У зб. наук. праць співробітників ЛМІ. -Луганськ, 1993. -С.28-29.
5. Корковий та медулярний ендогенний біосинтез простагландінів (ПГ) у присутності вазопресину //У зб.наук. праць співробітників ЛМІ. -Луганськ, 1993.-С.36. (в співавт. І.О.Комаревцева).
6. Рівень циклічних нуклеотидів у нирковій тканині, яку інкубували з ендогенними опіоїдами //У зб.наук. праць співробітників ЛМІ. -Луганськ, 1993. -С.82.

Підписано до друку 11.01.94. Формат 60x84/16. Папір друк. Друк офсетний. Умовн. друк. арк. 1,0. Тираж 100. Замовлення 221.
Обласна друкарня, 348040, Луганськ, вул. Ватутіна, 89а.